

补肾调肝方诱导衰老 BMSCs 成骨分化的实验研究

梁祖建 吴春飞 张百挡

中图分类号: R331.2⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013)03-0212-05

摘要: 目的 深入研究补肾调肝方诱导衰老骨髓间充质干细胞 (Bone Mesenchymal Stem Cells, BMSCs) 成骨分化的效应, 探讨补肾调肝方抗骨质疏松的机制。方法 贴壁培养法分离纯化大鼠 BMSCs, 用 D-半乳糖诱导制作 BMSCs 衰老模型, β -半乳糖苷酶染色检测 BMSCs 衰老情况。将培养成功的衰老 BMSCs 分为空白组、成骨诱导组和中药组, 培养 7d、14d 后行矿化结节茜素红染色 (Alizarin Red S, ARS), 倒置显微镜下观察矿化骨结节形成情况。结果 D-半乳糖诱导 BMSCs 呈现典型的细胞衰老形态和结构变化。在成骨诱导剂、补肾调肝方水提液的作用下, 与空白组比较, 衰老的 BMSCs 钙化结节数量明显增多, 差异有非常显著的统计学意义 ($P < 0.01$)。中药组的矿化结节明显多于成骨诱导组, 差异有非常显著的统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 D-半乳糖具有诱导 SD 大鼠 BMSCs 衰老的作用, 采用 D-半乳糖诱导培养可建立 BMSCs 衰老模型。补肾调肝方抗骨质疏松的机制之一是通过促进衰老 BMSCs 成骨分化。

关键词: 原发性骨质疏松症; 骨髓间充质干细胞; 补肾调肝

Experimental study of the osteogenic differentiation of aging bone mesenchymal stem cells induced by kidney-tonifying and liver-regulating recipes LIANG Zujian, WU Chunfei, ZHANG Baidang. The Affiliated Traumatic and Orthopedic Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510240, China

Corresponding author: LIANG Zujian, Email: liangzujian@gzucm.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the osteogenic differentiation of aging bone mesenchymal stem cells (BMSCs) induced by kidney-tonifying and liver-regulating recipes, and to explore its anti-osteoporosis mechanism. **Methods** BMSCs of SD rats were isolated with adherent separation method and primarily cultured in vitro. BMSCs senescence model was induced by D-galactose, and the senescence of BMSCs was detected by β -gal dyeing. Successfully cultured aging BMSCs were divided into 3 groups: blank group, osteo-induced group, and Chinese medicine group. After 7-day and 14-day culturing, Alizarin red staining was performed. And the formation of mineralized nodules was observed under phase-contrast microscope. **Results** Compared with control cells, BMSCs induced by D-galactose displayed morphological and biological senescent phenotype. Using osteogenic inducer and water extract of kidney-tonifying and liver-regulating recipes, the number of mineralized nodules was notably more than that in blank group. The difference was significant ($P < 0.01$). The number of mineralized nodules in Chinese medicine group was more than that in osteo-induced group ($P < 0.01$). **Conclusion** D-galactose can induce BMSCs senescence. BMSCs senescence model can be established by culturing with D-galactose. One possible mechanism of kidney-tonifying and liver-regulating recipes in treating osteoporosis is to promote osteogenic differentiation of aging BMSCs.

Key words: Primary osteoporosis; Bone mesenchymal stem cells; Kidney-tonifying and liver-regulating recipes

基金项目: 广东省社会发展领域科技计划项目 (2011028)

作者单位: 510240 广州, 广州中医药大学附属骨伤科医院 (梁祖建、张百挡); 510405 广州, 广州中医药大学 2011 级硕士研究生 (吴春飞)

通讯作者: 梁祖建, Email: liangzujian@gzucm.edu.cn

老年 OP 患者存在骨髓间充质干细胞 (Bone Mesenchymal Stem Cells, BMSCs) 衰老的改变, 衰老的 BMSCs 成脂和成骨分化能力失衡, 向成脂方向分化增多而向成骨方向分化减少是骨质疏松等成骨障碍疾病的发病机制^[1]。因此, 定向调控衰老的 BMSCs 成骨分化对骨再生具有重要意义。中药在干预衰老及诱导 BMSCs 成骨分化方面积累了大量的临床和基础研究资料, 显示出巨大的应用前景^[2,3], 但目前关于中药对衰老 BMSCs 的影响的研究较少。因此, 探讨中药调控衰老 BMSCs 成骨分化的效应对研究中药抗骨质疏松机制具有重要意义。本实验深入研究补肾调肝方对衰老 BMSCs 成骨分化的影响, 旨在探讨补肾调肝方抗骨质疏松的机制, 为临床应用补肾调肝方治疗高龄 OP 提供新的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级健康雌性 SD 大鼠 20 只, 3 月龄, 体重 200 ~ 220 g, 由广州中医药大学实验动物中心提供。

1.2 大鼠 BMSCs 的分离、培养与鉴定

大鼠置于 70% 乙醇中浸泡 10 分钟, 在无菌条件下分离大鼠股骨、胫骨, 去除软组织, 切除股骨、胫骨两端。将大鼠股骨、胫骨髓用 L-改良的 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 冲出, 将 4 ~ 5 根股骨、胫骨冲出的骨髓收集于同一烧杯中, 充分混匀, 转入离心管, 300 g 离心 10 min, 去上清, D-Hanks 重悬, 离心去上清, 加 4 ml D-Hanks 混匀。Percoll 分离液按 0.56:0.44 混合, 取 4 ml 放入 10 ml 离心管内。水平离心机 900 g 离心 30 min, 收集单核细胞层, 用含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 洗涤 2 次, 以 $4 \times 10^5/\text{cm}^2$ 密度接种到 25 ml 培养瓶中, 37℃, 5% 饱和湿度的 CO₂ 孵箱静置培养, 培养液为含 10% FBS 的 L-DMEM, 3 天后首次更换培养液, 去除悬浮细胞, 2 ~ 3 天换液 1 次, 细胞 70% ~ 80% 融合后用含 0.25% 胰酶室温消化 2 ~ 3 min, 按 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 传代, 传至第 3 代得到 $1 \times 10^7/\text{cm}^2$ 个细胞。采用流式细胞仪检测大鼠 BMSCs CD29、CD44、CD34 抗原表型。

1.3 D-半乳糖诱导 BMSCs 衰老

取部分第 3 代 BMSCs 改换在含 8g/L D-半乳糖 (D-galactose, D-gal) DMEM/F12 培养液培养, 继续培养至第 6 代, 即为 D-gal 诱导的 BMSCs 衰老模型, 作为诱导组。另一部分在原培养液中继续培养至第 6

代作为正常组。培养 11 天、21 天分别做衰老染色, 镜下观察细胞的数量、形态。

1.4 衰老染色检测

将正常组和诱导组 BMSCs 分别接种于 6 孔板, 调整细胞密度为 2.5×10^4 个/ml, 待长成单层后, 吸净培养液, 用 40 g/L 多聚醛固定细胞 45 min, 用 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase, β -gal) 染液 (含 20 mmol/L X-gal、40 mmol/L 醋酸-磷酸钠 (pH6.0)、5 mmol/L 铁氰化钾、5 mmol/L 亚铁氰化钾、150 mmol/L 氯化钠、2 mmol/L 氯化镁), 37℃ 保温 4 ~ 8 h, 然后用双蒸水冲洗 2 次, 再固定 4 min (固定液: 70% 乙醇、福尔马林、冰醋酸按 20:2:1 比例混合), 流水轻轻冲洗, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封固。细胞胞浆染成青绿色的为衰老的阳性细胞, 每张片镜下计数 400 个细胞, 确定 β -gal 染色阳性衰老细胞数的百分比。

1.5 补肾调肝方水提液制备

将补肾调肝方 (碎补 15 g、狗脊 15 g、白芍 30 g、柴胡 12 g、郁金 15 g、当归 15 g、玫瑰花 12 g、川楝子 12 g、川芎 10 g、白术 15 g、合欢皮 15 g、菊花 15 g、菖蒲 15 g、甘草 10 g), 每剂中药重 206 g, 将 2 剂中药 512 g 加入 1000 ml 水煎煮 1.5 h, 过滤, 药渣加 800 ml 水煎煮 1.5 h, 合并 2 次提取液约 600 ml, 减压浓缩到含生药浓度为 100 mg/ml, 调整 pH 7.2, 过 0.22 μm 滤膜除菌, 4℃ 保存, 用完全培养液 (含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液) 稀释到所需浓度。

1.6 衰老 BMSCs 的成骨诱导培养

将培养成功的衰老 BMSCs 随机分为 3 组, 空白组、成骨诱导组和中药组, 空白组不加任何处理因素, 培养液为含 10% FBS、50 U/ml 青霉素、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 L-DMEM; 成骨诱导组在空白组基础上加入 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 维生素 C + 10 mmol/L β -甘油磷酸钠 + 0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 地塞米松; 中药组在空白组基础上加入浓度为 1 mg/ml 的补肾调肝方水提液; 各组以 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 细胞密度接种入预先放置玻片的 24 孔培养板, 待细胞贴壁后, 按组加入处理因素, 复孔, 每 3 天换液 1 次。7 d、14 d 后行矿化结节茜素红染色 (Alizarin red staining, ARS), 倒置显微镜下观察矿化骨结节形成情况。

1.7 主要观察指标

衰老染色检测 D-gal 诱导 BMSCs 衰老情况及补肾调肝方水提液诱导衰老 BMSCs 的矿化骨结节形成情况。

1.8 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,建立数据库,数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用 Levene's test 法作方差齐性检验,计量资料满足正态性及方差齐性者两两之间比较用 t 检验,组内前后比较用配对 t 检验,方差不齐者用秩和检验 (Kruskal-Wallis H 检验)。率的比较用 Ridit 分析。统计学检验采用双侧检验,以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养的 BMSCs 形态学观察,见图 1

原代接种 24 h 后,细胞悬浮在淡黄色培养液中,形态呈圆形,胞体透亮,折光性强,大小不一,不能辨认细胞核,细胞与周围的红细胞等血系细胞相互混杂。48 h 首次换液后见大量贴壁细胞,部分伸出伪足呈短棒状,折光性强;6d 换液后见贴壁细胞数量增多,细胞伪足增长呈短梭形,贴壁分裂细胞形成不同大小、分散的细胞集落;7~10 d 后细胞集落迅速增加、长大,集落中心周围有放射状生长的贴壁细胞,胞体略大,形态均一,多呈梭形,排列紧密,细胞增殖迅速,集落相互融合;11 d 细胞逐渐融合成片,细胞间相互紧密贴附生长,呈旋涡状,细胞贴壁生长铺满培养瓶底部 90% 以上,可以进行首次传代。传代培养的 BMSCs 和原代细胞形态相似,传代至 2 代、3 代,细胞分裂相多见,胞体较大,细胞核较大,显示细胞功能活跃。

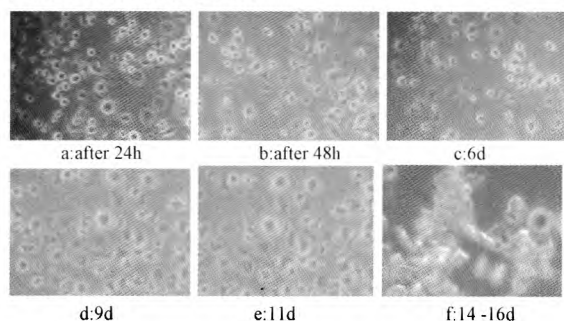


图 1 培养的 BMSCs 形态学观察

Fig. 1 Morphology of BMSCs in cultures.

2.2 BMSCs 细胞 CD29、CD44、CD34 表面标志物

流式细胞仪检测第 3 代 BMSCs 免疫表型显示: CD29、CD44 高表达,阳性细胞比率分别为 96.59% 和 93.86%, CD34 低表达阳性细胞比率分别为 0.23%,符合 BMSCs 表型特征。

2.3 D-gal 诱导 BMSCs 衰老染色检测,见表 1。

表 1 D-gal 诱导 BMSCs 衰老染色检测

Table 1 Senescent staining detection for BMSCs induced by D-gal

Group	Rate of BMSCs senescence (%)	
	After cultured for 11 d	After cultured for 21 d
normal group	23.97 $\pm$ 7.89	27.52 $\pm$ 10.26 [△]
induced group	61.19 $\pm$ 18.36 [▲]	78.81 $\pm$ 19.73 ^{▲*}

▲ $P < 0.01$, vs. the normal group after cultured with D-galactose for 11 days and 21 days; * $P < 0.01$, vs. after cultured with D-galactose for 11 days in the induced group; △ $P > 0.05$, vs. after cultured with D-galactose for 11 days in the normal group.

2.4 衰老 BMSCs 形态透视电镜观察,见图 2、图 3

D-gal 诱导的 BMSCs 呈典型的衰老形态和结构变化,细胞体积稍大,细胞扁平、胀大、颗粒增多,核增大、染色深,核膜内陷,核染色质凝聚、固缩、碎裂,形成不同形状的块状;细胞质色素积聚,存在大量空泡,线粒体数量减少,体积增大或肿胀,内质网扩张;但细胞膜保持完整。正常 BMSCs 核膜平整光滑,染色质分布均匀,胞浆内可见丰富的线粒体。

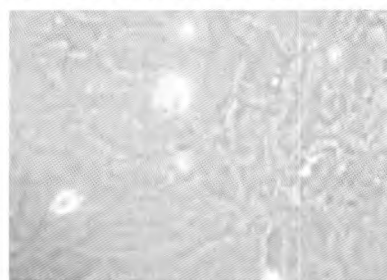


图 2 衰老 BMSCs 形态透视电镜观察

Fig. 2 TEM observation of the morphology of senescent BMSCs



图 3 正常的 BMSCs 形态学观察 (200 ×)

Fig. 3 Morphology of normal BMSCs (200 ×)

2.5 3 组矿化结节形成情况 见表 2、图 4。

在成骨诱导剂、补肾调肝方水提液的作用下,衰老的 BMSCs 变宽、成多角形、多个细胞逐渐向中间聚拢,形成矿化结节。成骨诱导 7 d 后行茜素红染色,与空白组比较,中药组、成骨诱导组钙化结节数量明

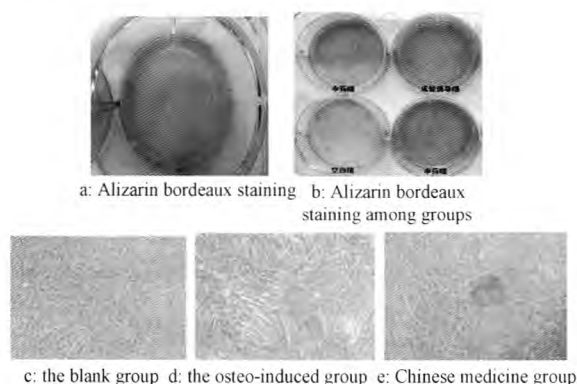


图 4 各组矿化结节形成情况

Fig. 4 Formation of mineralization nodules in each group

显增多,差异有非常显著的统计学意义($P < 0.01$)。14 d 后,空白组少见大量橘红色矿化结节形成,而中药组、成骨诱导组可见大量橘红色矿化结节形成,但中药组矿化结节的形成明显多于成骨诱导组。

表 2 3 组矿化结节形成情况

Table 2 Comparison of formation of mineralization nodules among the 3 groups

Group	7d	14d
blank group	1.78 ± 0.31	2.21 ± 0.34 *
osteo-induced group	3.53 ± 0.40 *	4.76 ± 0.81 **
Chinese medicine group	4.21 ± 0.28 *▲	5.38 ± 0.85 **●

* $P < 0.01$, after cultured for 14 days vs. for 7 days; * $P < 0.01$, vs. the blank group after cultured for 7 days and 14 days; ▲ $P < 0.01$, Chinese medicine group vs. the osteo-induced group after cultured for 7 days; ● $P < 0.01$, Chinese medicine group vs. the osteo-induced group after cultured for 14 days.

3 讨论

衰老会导致 BMSCs 增殖能力和多向分化潜能的下降,并引起骨髓基质环境等的改变,逐渐丧失了修复和自我更新能力,导致组织和器官出现以退行性改变为特征的衰老表现^[4]。研究表明,无论是在骨骼发生阶段,还是发育阶段,BMSCs 的数量和功能都是维持骨骼正常生理机能的决定性因素^[5]。人 BMSCs 的数量和增殖随年龄增长而降低^[6]。体外培养的 BMSCs 伴随氧化应激而增高,存在着细胞老化、干细胞样特征丢失现象^[7]。因此,深入研究 BMSCs 老化机制,干预 BMSCs 衰老过程中基因水平,调控基因表达环境,建立“永生化”的 BMSCs,对防治骨衰老具有重要意义。目前许多学者试图探索一种安全有效的建立永生化 BMSCs 的方法,既能保持多次传代培养后细胞的多能性,又能有效降低永

生化细胞的瘤变率^[8]。所以,建立 BMSCs 衰老模型是研究骨衰老相关研究的基本需要。代平等^[9]虽然从老年 OP 患者髌骨中抽取骨髓成功获取骨组织工程中所要求种子细胞数量级的 BMSCs,但在临床研究中操作非常困难,许多老年 OP 患者不愿意或拒绝行相关研究,因此无法推广应用。D-gal 可作为一种致老剂,能诱导细胞及整体动物衰老^[10]。研究证实,在运用 D-gal 建立衰老大鼠模型过程中,会导致骨质疏松,其原因可能是摄入的大量活性氧从整体、细胞和基因不同层次上影响骨的代谢所致^[11]。如 D-gal 产生过多的自由基,破坏细胞膜,使细胞中蛋白质发生交联、变性,导致细胞的死亡;D-gal 可致成骨细胞数量减少,活性降低,而致破骨细胞活性增强^[12,13];另外,自由基破坏胶原蛋白形成,导致骨中矿物质沉积减少,同时破坏骨小梁的立体空间结构,发生微骨折,导致骨质量下降^[14]。目前尚无 D-gal 致整体动物衰老后,BMSCs 衰老情况的深入研究。因此本研究运用 D-gal 直接诱导 BMSCs 衰老来进行相关研究。参考文献报道,中等浓度(8 g/L) D-gal 使 BMSCs 活力降低,高浓度(16 g/L) D-gal 使 BMSCs 负增长,表明 D-gal 能使 BMSCs 增殖速度减慢,但 D-gal 浓度过高,会使细胞受到损伤,引起细胞的凋亡或死亡^[15]。因此,本研究选择 8 g/L 浓度 D-gal 进行 BMSCs 衰老诱导的研究,结果表明 D-gal 诱导培养 11 天后即建立了 BMSCs 衰老模型。镜下观察示,诱导的 BMSCs 呈典型的衰老形态和结构变化,细胞体积稍大,细胞扁平、胀大、颗粒增多,核增大、染色深,核膜内陷,核染色质凝聚、固缩、碎裂,形成不同形状的块状;细胞质色素积聚,存在大量空泡,线粒体数量减少,体积增大或肿胀,内质网扩张,但细胞膜保持完整。 β -gal 与衰老相关,衰老细胞在 pH 值为 6 时表现出 β -gal 活性染色阳性,通过原位染色,在普通的光学显微镜下就可以用于检测到 β -gal 的表达^[16],本研究表明 β -gal 活性高,染色明显,与文献报道相符。

衰老是人生理变化的自然规律,不能扭转,OP 发生的根本原因是机体的衰老。人胚胎早期发育与 BMSCs 的增生、分化密切相关,自然衰老的过程往往伴有各系统的萎缩和功能的下降,这些都和 BMSCs 的数量减少以及功能衰退有关^[17]。目前认为重新激活 BMSCs 的功能,能提高老年人在衰老时的多项功能,因此,阻碍 BMSCs 衰老具有重要意义。OP 患者 BMSCs 增殖、成骨分化以及对生长因子的有丝分裂反应能力均下降,同时成脂增加和 I 型胶

原减少,钙化结节形成较少,从而导致成骨减少,破骨增强^[18]。许多临床资料和实验研究表明中医的补益方药,尤其是补肾药物在延缓机体衰老的发生,特别是对神经-内分泌-免疫网络的调控方面有一定作用^[19,20]。BMSCs成骨分化特性与中医“肾藏精,精生髓,髓生骨”的理论有较高的吻合^[21]。因为BMSCs主要来自于骨髓(髓),属中医“髓”的范畴。BMSCs是成骨细胞系的前体,在特定环境下能向成骨分化,即实现“髓生骨”。张进等^[22]认为“先天之精”与干细胞的基本功能、属性较相似,补肾药物促进BMSCs的增殖和成骨分化证实“肾-髓-骨”之间的关联。BMSCs成骨活性弱,骨化过程较慢,因此,如何提高BMSCs的成骨潜能,使其高效地向成骨细胞分化,将是BMSCs分化研究中的关键问题。钙结节是OB分泌的胶原亲合钙盐而成,钙结节的形成是成骨细胞分化成熟的重要标志之一。本实验证实,补肾调肝方水提液能增多钙化结节数量,说明补肾调肝方对BMSCs向成骨细胞分化有明显的诱导作用,且随着浓度的提高,这种作用更加明显,为临床运用补肾调肝方治疗OP提供了实验室依据。此外本实验还发现,衰老BMSCs存在一定成骨分化能力,提示老年OP是可防可治。本研究还发现,补肾调肝方较成骨诱导剂更为迅速地增多钙化结节数量,说明补肾调肝方更能促进BMSCs向成骨分化,表明中药抗骨质疏松更具有优势。最近有研究报道,中药能给细胞提供一个更加稳定的微环境,利于细胞的代谢。据此,我们推测补肾调肝方能保护BMSCs,支持BMSCs成骨分化,加快骨矿化基质的形成,缩短骨细胞的成熟时间。但BMSCs的增殖和分化机制较为复杂,可能存在较多的作用靶点和信号通路,补肾调肝方在这个过程中可能存在更多的干预机制和影响因素,需要进一步深入研究,为临床应用提供更为确切的客观依据。

【参 考 文 献】

- [1] Weixi Zhang, Guomin Ou, Mark Hamrick, et al. Age-related changes in the osteogenic differentiation potential of Mouse Bone Marrow Stromal Cells. *J Bone Miner Res*, 2008, 23(7): 1118-1128.
- [2] 舒晓春,刘君静,朱丹华,等. 不同浓度的骨碎补总黄酮对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的影响. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(7): 1261-1264.
- [3] 谭峰,樊巧玲,王明艳,等. 左归丸对SD大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(7): 145-148.
- [4] 陈槐卿,药蓉,韩君,等. 增龄对大鼠骨髓基质细胞生长分化的影响. *中国医学科学院学报*, 2003, 3: 244-249.
- [5] Jeffrey MG, Mark EN. The relationship between adipose tissue and bone metabolism. *Clinical Biochemistry*, 2012, 4(12): 874-879.
- [6] Norihiko Nakano, Yoshiyasu Nakai, Tae-Boem Seo, et al. Characterization of conditioned medium of cultured bone marrow stromal cells. *Neuroscience Letters*, 2010, 483(1): 57-61.
- [7] E Potier, J Noailly, K Ito. Directing bone marrow-derived stromal cell function with mechanics. *Journal of Biomechanics*, 2010, 43(5): 807-817.
- [8] Murielle Mimeault, Surinder KB. Recent insights into the molecular mechanisms involved in aging and the malignant transformation of adult stem/progenitor cells and their therapeutic implications. *Ageing Research Reviews*, 2009, 8(2): 94-112.
- [9] 代平,詹瑞森,王卫国. 骨质疏松患者体外培养BMSCs的生物学特性. *医学临床研究*, 2007, 12(24): 2019-2023.
- [10] Bei Chen, Yi Zhong, Wei Peng, et al. Age-related changes in the central auditory system: Comparison of d-galactose-induced aging rats and naturally aging rats Original. *Brain Research*, 2010, 1344(16): 43-53.
- [11] 裴凌鹏,董福慧,惠伯棣. D-半乳糖致衰老作用对大鼠骨质的影响. *中医正骨*, 2007, 19(3): 1-3.
- [12] 覃冬云,吴铁,崔燎,等. D-半乳糖导致小鼠骨丢失及其机制初探. *中国药理学通报*, 2003, 19(9): 1017-1019.
- [13] Chunwang Fu, Tiejie Wang, Yang Wang, et al. Metabonomics study of the protective effects of green tea polyphenols on aging rats induced by d-galactose. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, 55(5): 1067-1074.
- [14] Runguang Li, Bin Chen, Gang Wang, et al. Effects of mechanical strain on oxygen free radical system in bone marrow mesenchymal stem cells from children. *Injury*, 2011, 42(8): 753-757.
- [15] 邢玉芝,杨玲麟,林洪,等. D-半乳糖对大鼠骨髓间充质干细胞拟衰老作用的实验研究. *中国修复重建外科杂志*, 2006, 20(4): 475-479.
- [16] Joseph Severino, RG Allen, Samuel Balin, et al. Is β -Galactosidase Staining a Marker of Senescence in Vitro and in Vivo?. *Experimental Cell Research*, 2000, 257(1): 162-171.
- [17] Christine Fehrer, Günter Lepperding. Mesenchymal stem cell aging. *Experimental Gerontology*, 2005, 40(12): 926-930.
- [18] Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, et al. Bone regeneration and stem cells. *J Cell Mol Med*. 2011, 15(4): 718-46.
- [19] 王正引,张小如,梁海凌. 近10年补肾方药延缓衰老实验研究述要. *中华中医药杂志*, 2011, 26(11): 2648-2651.
- [20] 马书娟,姚建平. 补肾方药延缓衰老实验研究概况. *世界中西医结合杂志*, 2012, 7(8): 721-724.
- [21] 卞琴,沈自尹,王拥军. 骨髓间充质干细胞在中医理论中的归属. *中国中医基础医学杂志*, 2011, 17(7): 794-797.
- [22] 张进,徐志伟,丁富平. “肾藏精”的现代实质新理论. *世界科学技术-中医药现代化*, 2010, 12(4): 550-552.

(收稿日期:2012-10-03)

补肾调肝方诱导衰老BMSCs成骨分化的实验研究

作者: [梁祖建](#), [吴春飞](#), [张百挡](#), [LIANG Zujiang](#), [WU Chunfei](#), [ZHANG Baidang](#)
作者单位: [梁祖建, 张百挡, LIANG Zujiang, ZHANG Baidang \(广州中医药大学附属骨伤科医院, 广州, 510240\)](#), [吴春飞](#), [WU Chunfei \(广州中医药大学, 广州, 510405\)](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [Chinese Journal of Osteoporosis](#)
年, 卷(期): 2013, 19 (3)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201303004.aspx